

## NEW ANTIMICROBIAL PROTEIN, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

Patent number: JP8283292  
Publication date: 1996-10-29  
Inventor: YAMAKAWA MINORU; YAMAMOTO MASANORI  
Applicant: NORIN SUISANSYO SANSHI KONCHU NOGYO GIJUTSU  
KENKYUSHO;; SHIKIBO LTD  
Classification:  
- international: C07K7/08; A01N63/00; C07K1/20; C07K14/435  
- european:  
Application number: JP19950088393 19950413  
Priority number(s):

## Abstract of JP8283292

PURPOSE: To obtain an antimicrobial protein derived from a larva of an insect belonging to the order Coleoptera and to provide a method for producing the protein and develop its use.

CONSTITUTION: This antimicrobial protein is induced in the humor of a larva when a body surface of the larva of an insect belonging to the order Coleoptera is injured, has an N-end amino acid sequence of the formula N2 N-Val-Pro-Val- Gly-Ser-Asp-Pro-Glu-Pro-Lys-Leu-Met-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-His- and the following properties or an antimicrobial protein having immunologically common antigenicity with the antimicrobial protein. (i) About 7,100-7,300 molecular weight. (ii) Thermal stability (5-10 minutes at 100 deg C).

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-283292

(43) 公開日 平成8年(1996)10月29日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/08			C 0 7 K 7/08	
A 0 1 N 63/00			A 0 1 N 63/00	A
C 0 7 K 1/20			C 0 7 K 1/20	
14/435	Z N A	8517-4H	14/435	Z N A
// A 6 1 K 38/00	A D Z		A 6 1 K 37/02	A D Z
審査請求 有 請求項の数12 O L (全 6 頁)				

(21) 出願番号 特願平7-88393

(22) 出願日 平成7年(1995)4月13日

(71) 出願人 391030284

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所長  
茨城県つくば市大わし1-2

(71) 出願人 000238234

数島紡績株式会社  
大阪府大阪市中央区備後町3丁目2番6号

(72) 発明者 山川 稔

茨城県つくば市吾妻2-11-802-404

(72) 発明者 山本 真則

茨城県牛久市刈谷町4-46

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54) 【発明の名称】 新規抗菌性蛋白、その製造法および用途

(57) 【要約】

【目的】 鞘翅目に属する昆虫の幼虫由来の抗菌性蛋白、その製造法および用途を提供する。

【構成】 鞘翅目に属する昆虫の幼虫の体表傷害時にその幼虫の体液中に誘導される、N末端アミノ酸配列がH<sub>2</sub>N-Val-Pro-Val-Gly-Ser-Asp-Pro-Glu-Pro-Lys-Leu-Met-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-His-であり、下記の性質を有する抗菌性蛋白、またはこれと免疫学的に共通抗原性を有する抗菌性蛋白。

(i) 分子量約7,100~7,300

(ii) 熱安定性(5~10分間、100℃)

【効果】 鞘翅目に属する昆虫の幼虫由来の抗菌性蛋白、その製造法およびそれを有効成分とする可食性抗菌剤が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 鞘翅目に属する昆虫の幼虫の体表傷害時にその幼虫の体液中に誘導される、N末端アミノ酸配列が  $H_2N-Val-Pro-Val-Gly-Ser-Asp-Pro-Glu-Pro-Lys-Leu-Met-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-His-$  であり、下記の性質を有する抗菌性蛋白、またはこれと免疫学的に共通抗原性を有する抗菌性蛋白。

(i) 分子量約 7,100~7,300

(ii) 熱安定性 (5~10 分間、100℃)

【請求項 2】 鞘翅目に属する昆虫がタイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) である、請求項 1 記載の抗菌性蛋白。

【請求項 3】 幼虫が三令幼虫である、請求項 1 または 2 に記載の抗菌性蛋白。

【請求項 4】 幼虫の体液が体表傷害後 0~10 日経過後のものである、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 に記載の抗菌性蛋白。

【請求項 5】 鞘翅目に属する昆虫の幼虫の体表に傷害を与え、その後得られる体液より体液細胞および脂肪体を除去したものから、N末端アミノ酸配列が  $H_2N-Val-Pro-Val-Gly-Ser-Asp-Pro-Glu-Pro-Lys-Leu-Met-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-His-$  であり、下記の性質を有する抗菌性蛋白、またはこれと免疫学的に共通抗原性を有する抗菌性蛋白を取得することを特徴とする、抗菌性蛋白の製造法。

(i) 分子量約 7,100~7,300

(ii) 熱安定性 (5~10 分間、100℃)

【請求項 6】 鞘翅目に属する昆虫がタイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) である、請求項 5 記載の製造法。

【請求項 7】 幼虫が三令幼虫である、請求項 5 または 6 に記載の製造法。

【請求項 8】 幼虫の体液が体表傷害後 0~10 日経過後のものである、請求項 5 ないし 7 のいずれか 1 に記載の製造法。

【請求項 9】 鞘翅目に属する昆虫の幼虫の体表傷害時にその幼虫の体液中に誘導される、N末端アミノ酸配列が  $H_2N-Val-Pro-Val-Gly-Ser-Asp-Pro-Glu-Pro-Lys-Leu-Met-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-His-$  であり、下記の性質を有する抗菌性蛋白、またはこれと免疫学的に共通抗原性を有する抗菌性蛋白を有効成分とする可食性抗菌剤。

(i) 分子量約 7,100~7,300

(ii) 熱安定性 (5~10 分間、100℃)

【請求項 10】 鞘翅目に属する昆虫がタイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) である、請求項 9 記載の可食性抗菌剤。

【請求項 11】 幼虫が三令幼虫である、請求項 9 または 10 に記載の可食性抗菌剤。

【請求項 12】 幼虫の体液が体表傷害後 0~10 日経過後のものである、請求項 9 ないし 11 のいずれか 1 に記載の可食性抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、鞘翅目に属する昆虫の幼虫体表傷害時にその幼虫の体液中に誘導される抗菌性蛋白類およびその製造法ならびにその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 細菌や異種の血球を昆虫に接種したり、単に体表に傷をつけるといった刺激を与えると体液中に数々の抗菌性蛋白が誘導されることが知られている。これらの物質は、抗体産生能をもたない動物の生体防御にとって重要な関わりがあるものと考えられる。これらのうちで、例えばゴミムシダマシ科の一種 (*Zophobas atratus*) 幼虫体液中に誘導される活性蛋白として、抗菌活性をもつ蛋白 (J. Biol. Chem.、266 巻、24520-24525 頁 (1991)) などが固定されている。その抗菌活性をもつ蛋白としては、コレオプテリシン (*Coleopterisin*) と命名され、その理化学的性質も明らかにされている蛋白、および同じくゴミムシダマシ科の一種 (*Zophobas atratus*) の幼虫体液から得られ、ディフェンシンググループに属し、その理化学的性質も明らかにされている蛋白等が知られている。これらは幅広い抗菌スペクトルを有することから、生体防御物質と考えられ、さらにこれらの抗菌性蛋白は、特にグラム陰性菌の大腸菌およびグラム陽性菌のミクロコッカスに対して強い抗菌力を有している。

【0003】 一方、近年、高等哺乳動物でも、精液中や血清中に、抗菌力が強く幅広いスペクトルをもつ抗菌性蛋白の存在が明らかとなり、一般の動物体液中の抗菌性蛋白が重要視されている。

【0004】 しかしながら、他の鞘翅目に属する昆虫の抗菌性蛋白については、ほとんど精製・分離がなされておらず、物質の性状等の理化学的性状は明らかにされていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 かかる事情に鑑み、本発明は、鞘翅目に属するタイワンカブトムシの抗菌性蛋白について精製・分離方法を確立し、物質の性状、N末端アミノ酸配列等の理化学性状を明らかにすることを目的とする。したがって、この蛋白性物質が単一なまでに精製・分離でき、そのアミノ酸配列が決定され、さらにこれら昆虫由来の蛋白がヒトなどの脊椎動物の生体防御機構に働くとなれば、例えば医学・薬学的見地からも寄与するところは大きい。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、意外にも、鞘翅目に属する昆虫、とりわけタイワンカブトムシ幼虫の体表傷害時にその体液中に

抗菌性蛋白が誘導されることを見だし、その精製・分離に成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、

(1) 鞘翅目に属する昆虫の幼虫の体表傷害時にその幼虫の体液中に誘導される、N末端アミノ酸配列がH<sub>2</sub>N-Val-Pro-Val-Gly-Ser-Asp-Pro-Glu-Pro-Lys-Leu-Met-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-Hisであり、下記の性質を有する抗菌性蛋白、またはこれと免疫学的に共通抗原性を有する抗菌性蛋白

(i)分子量約7,100~7,300

(ii)熱安定性(5~10分間、100℃)

(2) 鞘翅目に属する昆虫がタイワンカブトムシ(*Oryctes rhinoceros*)である、(1)記載の抗菌性蛋白

(3) 幼虫が三令幼虫である、(1)または(2)に記載の抗菌性蛋白

(4) 幼虫の体液が体表傷害後0~10日経過後のものである、(1)ないし(3)のいずれか1に記載の抗菌性蛋白、および、

【0008】(5) 鞘翅目に属する昆虫の幼虫の体表に傷害を与え、その後得られる体液より体液細胞および脂肪体を除去したものから、N末端アミノ酸配列がH<sub>2</sub>N-Val-Pro-Val-Gly-Ser-Asp-Pro-Glu-Pro-Lys-Leu-Met-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-Hisであり、下記の性質を有する抗菌性蛋白、またはこれと免疫学的に共通抗原性を有する抗菌性蛋白を取得することを特徴とする、抗菌性蛋白の製造法

(i)分子量約7,100~7,300

(ii)熱安定性(5~10分間、100℃)

(6) 鞘翅目に属する昆虫がタイワンカブトムシ(*Oryctes rhinoceros*)である、(5)記載の製造法

(7) 幼虫が三令幼虫である、(5)または(6)に記載の製造法

(8) 幼虫の体液が体表傷害後0~10日経過後のものである、(5)ないし(7)のいずれか1に記載の製造法、ならびに、

【0009】(9) 鞘翅目に属する昆虫の幼虫の体表傷害時にその幼虫の体液中に誘導される、N末端アミノ酸配列がH<sub>2</sub>N-Val-Pro-Val-Gly-Ser-Asp-Pro-Glu-Pro-Lys-Leu-Met-Thr-Met-Asp-Leu-Val-Pro-Hisであり、下記の性質を有する抗菌性蛋白、またはこれと免疫学的に共通抗原性を有する抗菌性蛋白を有効成分とする可食性抗菌剤

(i)分子量約7,100~7,300

(ii)熱安定性(5~10分間、100℃)

(10) 鞘翅目に属する昆虫がタイワンカブトムシ(*Oryctes rhinoceros*)である、(9)記載の可食性抗菌剤

(11) 幼虫が三令幼虫である、(9)または(1

0)に記載の可食性抗菌剤

(12) 幼虫の体液が体表傷害後0~10日経過後のものである、(9)ないし(11)のいずれか1に記載の可食性抗菌剤を提供するものである。

【0010】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、「免疫学的に共通抗原性を有する抗菌性蛋白」とは、1個またはそれ以上のアミノ酸を置換または削除した抗菌性蛋白であって、共通の抗原性を有する抗菌性蛋白をいう。

10 【0011】本発明で対象とする昆虫は鞘翅目に属する昆虫である。具体的には、コガネムシ、ゴミムシダマシなどがある。これらのうちでは、コガネムシ科のコカブトムシ、特にタイワンカブトムシが好ましい。

【0012】対象昆虫は、幼虫でなければならない。ここで「幼虫」とは、昆虫の完全変態の過程において、孵化後、蛹化前のものをいう。本発明で適当なものは、三令に同調してある幼虫、特に三令に同調してあるタイワンカブトムシ幼虫である。

20 【0013】抗菌性ペプチドを誘導すべく昆虫体液に傷害を与える操作は、結果的に感染の危険を増大させる任意の方法が可能である。「体表」といっても体表のみを意味するものではなく、注射針の貫通のように体内にも傷害を与える操作をも包含することは言うまでもない。傷害を与えるべき体表は、昆虫の体のどこであってもよいが、通常は頭部を除く部分である。

【0014】傷害を与えて0~10日後、望ましくは約1日後、体液をしぼり出し、遠心分離により体液細胞を除き、出発材料とする。

30 【0015】本発明抗菌性蛋白の分離・精製には、一般の蛋白類の分画と精製に常用される様々な方法が適用できる。本発明において、特にタイワンカブトムシ幼虫を用いる場合、上記で得られた遠心上清を逆相クロマトグラフィーで分画し、各画分について後に述べる抗菌活性の測定法に従って有意な活性を示す画分を分取し、さらに逆相クロマトグラフィーを繰り返し単一のピークにまで精製できる。

【0016】該遠心画分から本発明の単一な物質まで精製する場合、上記以外にも様々な方法が考えられ、例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、電気泳動などを適宜用いて目的を達することが可能である。

【0017】このようにして得られた抗菌性物質はトリブシン処理によって失活することから、蛋白性物質であることが明らかである。この抗菌性蛋白は、凍結乾燥を行なうと白色粉末として得られる。

【0018】また、本発明の抗菌性蛋白は耐熱性が良好であるので、粗標品を加熱することによって純化して比活性を高めることができる。すなわち、粗標品を80~120℃、好ましくは100℃前後で10~60分程度の熱処理に付すと好都合である。

【0019】本発明による抗菌性蛋白の抗菌活性の測定法は、例えば、グラム陽性菌の場合は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) または溶血レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) を用いて、その増殖阻止率を指標として測定できる。

【0020】本発明による抗菌性蛋白は、その抗菌性を生かして抗菌剤として有用である。すなわち、それ単独で、あるいは適当な液体、固体または気体の担体ないし希釈剤と組み合わせた形態で、あるいは他の薬剤と組み合わせられた形態で、外用あるいは内用の抗菌剤として使用 10 することができる。

【0021】したがって、本発明の抗菌性ペプチドは、例えば、細菌性疾患に対する薬剤として使用することができる。その場合は、投与の剤型およびその投与量については、患者および疾患の種類、症状等を勘案して、本発明による抗菌効果が認められる限り任意の選択が可能である。

【0022】本発明の抗菌性蛋白は蛋白質そのものであるもので、少なくとも結果的に経口にて接種されるときには、その毒性はほとんどないと考えられる。したがって、この抗菌性ペプチドは、ヒトおよび動物用の薬剤および食品ないし飼料添加物として利用することができる。例えば、本発明による抗菌性蛋白は食品添加物としての抗菌剤、換言すれば可食性抗菌剤として有用である。

#### 【0023】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

#### 【0024】1) 材料および測定法

##### (1) 出発材料

タイワンカブトムシ幼虫は、三令幼虫を用いた。体表に傷害を与える操作は、幼虫を氷上に数分間置いて動きを鈍くしてから皮下針を貫通させるという方法を用いた。傷害を与えた幼虫を腐葉土の入った容器中、25℃にて24~48時間飼育した。その後、幼虫脚部を切断し、腹部を押さえてしぼり出すことにより、氷上のチューブ中に体液滴を採取した。通常1匹の幼虫から約1.5mlの体液が得られた。得られた体液を39,000×g/50分間の遠心分離に付して血球成分を除き、澄明な上清を-20℃で保存した。

##### 【0025】(2) 体液の分画

約10匹の幼虫から採取した体液(約15ml)を溶媒A(20%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸)で平衡化しておいたSep-Pak C<sub>18</sub>カートリッジ(Waters Associates社製)にアブライした。溶媒Aでカラムを洗浄後、60%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸で抗菌活性を溶出させた。この活性画分について、アセトニトリルを除去するために、凍結乾燥を行なった。この乾燥粉末を0.05%トリフルオロ酢酸に

溶解し、0.05%トリフルオロ酢酸で平衡化しておいたProRPC HR5/10 C<sub>18</sub>カラム(Pharmacia社製、5×100mm)にアブライした。0.05%トリフルオロ酢酸でカラムを洗浄後、0%→50%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸(75分間)の条件でグラジェント溶出を行なった。この段階で、抗菌活性はアセトニトリル26~31%画分に溶出された。この活性画分について、アセトニトリルを除去するために、凍結乾燥を行なった。さらに、この乾燥粉末を溶媒Aに溶解し、溶媒Aで平衡化しておいたProRPC HR5/10 C<sub>18</sub>カラム(Pharmacia社製、5×100mm)にアブライした。溶媒Aでカラムを洗浄後、20%→40%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸(120分間)という緩やかなグラジェント条件で溶出を行なった。この段階で、抗菌活性はアセトニトリル22~24%画分(B画分)およびアセトニトリル24~27%(C画分)の二つの画分に分離された。これらの活性画分について、アセトニトリルを除去するために、凍結乾燥を行なった。本発明はC画分から抗菌性蛋白類(オリクチン)を精製してなされたものである。

#### 【0026】(3) 抗菌活性の測定

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) または溶血レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) を培養し、指数増殖期の細胞を選択し、60mM NaCl含有の30mMリン酸緩衝液(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.0)中に懸濁させた(Beckman社製 DU-650分光計でA<sub>550</sub>, 0.1(1.5×10<sup>7</sup>細胞数/ml))。試料(50μl)、ミューラー・ヒントン培地(40μl, Difco社製)および細菌懸濁液(10μl)をマイクロチューブ中に混合し、振盪しながら37℃、20時間インキュベートした。その後その混合物を急冷してA<sub>550</sub>を測定した。

#### 【0027】(4) トリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

スラブ式トリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、SchaggerおよびJagowの方法(Anal. Biochem., 166巻、368-379頁(1987))に従って行なった。蛋白試料をSDSゲルローディング緩衝液(50mM Tris-HCl(pH6.8), 10%β-メルカプトエタノール, 2% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム), 0.1%プロモフェノール・ブルー, 10%グリセロール)に溶解し、100℃、5分間加熱処理後、トリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。ゲルのアクリルアミド含量は16.2%であった。電気泳動後、ゲルをフェアバンクスらの方法(Biochemistry, 10巻、2606-2617頁(1971))によってクマシブリリアントブルーR-250で染色した。

#### 【0028】2) オリクチンの精製

約10匹の幼虫から得られた約140μgのC画分は、130mM NaCl含有の10mMリン酸緩衝液(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH6.0)に溶解し、熱沈澱性蛋

白を完全に除去するため、100℃で5分間加熱処理した。そして、その調製物を10分間/39,000×gの遠心分離に付し、得られた上清を最終的に30%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸が含まれるように調製し、溶媒B(30%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸)で平衡化しておいた逆相カラム(2.1×100mm, Pharmacia社製  $\mu$ RPC C2/C18)にアブライした。この逆相カラムはファルマシア社製SMARTシステムに連結させて用いた。溶媒Bでカラムを洗浄後、30%→40%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸(60分間)という緩やかなグラジエント条件で溶出を行なった。200 $\mu$ lずつ分画し、アセトニトリルを除去するために、凍結乾燥を行ない、各々の画分について測定した。抗菌活性は、第1図に示すように蛋白のピークに一致する単一のピークとして溶出した。活性画分はトリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一蛋白バンド(分子量約7,100~7,300)を与え、オリクチンと命名した。精製されたオリクチンの電気泳動図を第2図に示す。図中、矢印は指標蛋白(ミオグロビンI & II(14.1 kDa)、ミオグロビンI(8.2 kDa)、ミオグロビンII(6.2 kDa)およびミオグロビンIII(2.5 kDa))の位置を示す。蛋白量はローリーの方法(J. Biol. Chem., 193巻、265-275頁(1951))により、スタンダードとして合成カイコ・セクロビンBを用いて測定した。精製された本発明の生理活性蛋白オリクチンをエドマン分解し、PTH-アミノ酸を分析したところ、N末端のアミノ酸19個の配列(配列番号:1)\*

配列:

Val	Pro	Val	Gly	Ser	Asp	Pro	Glu	Pro	Lys	Leu	Met	Thr	Met	Asp	Leu	Val	Pro
1				5					10						15		
His																	

【図面の簡単な説明】

【図1】 精製オリクチンの逆相SMART分析結果を示す説明図である。

【図2】 オリクチンの電気泳動図を模写した図であ ※

\*が決定された。

【0029】3)オリクチン濃度と抗菌活性の測定

2)で精製され得られた抗菌性蛋白オリクチンを用いて測定した。なお、1)-(3)の抗菌活性の測定において被検液50 $\mu$ l中の蛋白量を0~10 $\mu$ g/mlと変化させて測定した。その結果を第3図に示す。この結果より、本発明の生理活性蛋白オリクチンの抗菌活性は、グラム陽性菌および陰性菌の両方に対して強く認められた。

【0030】また、本発明の生理活性蛋白オリクチンは、100℃で5~10分間熱処理した後であっても、もとの抗菌活性を保持していた。

【0031】

【発明の効果】本発明による抗菌性ペプチドはそれ自体抗菌性を有し、しかも毒性はほとんどない。したがって、この性質を利用できる種々の用途が考えられるが、特にこれらの物質を有効成分とする医薬品製剤としての応用、あるいは食品添加物としての利用が期待できる。とりわけ、タイワンカブトムシ幼虫より取得した抗菌性ペプチドは、熱安定性であり、熱による加工工程を含む用途には特に利用が期待できるものである。

【0032】

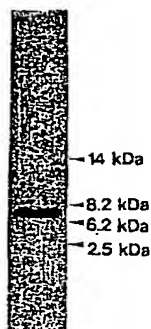
【配列表】

配列番号: 1  
配列の長さ: 19  
配列の型: アミノ酸  
トポロジー: 直鎖状  
配列の種類: ペプチド

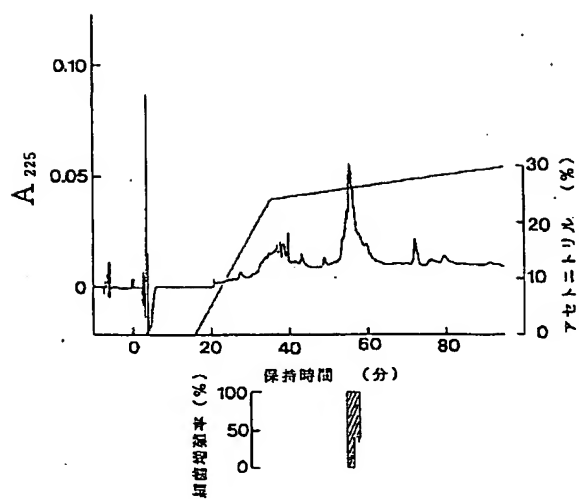
※る。

【図3】 本発明のオリクチンの抗菌作用を示す図である。

【図2】



【図1】



【図3】

